



Foto: Maria Laura T. Mattos

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



COMUNICADO
TÉCNICO

376

Pelotas, RS
Novembro, 2020

Embrapa

Efeito de Agentes de Biocontrole sobre Bactérias Degradadoras de Resíduos de Agrotóxicos e Fixadoras de Nitrogênio

Maria Laura Turino Mattos
José Francisco da Silva Martins
Marta Cristina Corsi de Fillipi

Efeito de Agentes de Biocontrole sobre Bactérias Degradadoras de Resíduos de Agrotóxicos e Fixadoras de Nitrogênio¹

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

A lavoura de arroz irrigado no Sul do Brasil, especificamente no Rio Grande do Sul (RS), apresenta elevado nível de tecnificação e produtividade, com base no uso de agrotóxicos para o controle de doenças, insetos e plantas daninhas, o que aumenta os custos de produção e os riscos de contaminação ambiental. O emprego de agentes de biocontrole é um método alternativo para o manejo integrado de pragas nessas lavouras (Martins et al., 2004). Porém, microrganismos com potencial para a mitigação de solos orizícolas contaminados por resíduos de agrotóxicos (Mattos et al., 2008, 2010) ou promotores da fixação biológica de nitrogênio em arroz (Mattos et al., 2012) e soja (Hungria et al., 2007) podem ser afetados pelos agentes de biocontrole.

Diante do crescimento do mercado de defensivos agrícolas biológicos, na ordem de 15% no Brasil (CropLife, 2020), há perspectiva do aumento do uso de produtos de base biológica no manejo de cultivo de arroz no RS e, ao

mesmo tempo, há um desconhecimento sobre a toxicidade dos biocontroladores sobre bactérias nativas e/ou estabelecidas nos solos com drenagem natural deficiente, nas terras baixas do RS.

Dessa forma, há necessidade de pesquisas para avaliar o antagonismo de agentes biológicos contra bactérias e fungos com potencial agrícola de interesse biotecnológico. Estudos recentes demonstram os efeitos antagônicos entre os microrganismos (bactérias e fungos) usados para o controle de doenças de culturas agrícolas (Brito et al., 2018; Gomes et al., 2001). Assim, bactérias não alvo (BNA), com diferentes funcionalidades para agricultura e meio ambiente, como degradadoras de agrotóxicos e fixadoras de nitrogênio presentes no ambiente de produção de grãos nas terras baixas, também podem sofrer o efeito antagônico dos agentes de biocontrole de pragas (ABP) das lavouras de arroz irrigado.

O presente trabalho apresenta duas contribuições metodológicas de avaliação do efeito antagonista de agentes de biocontrole de pragas (ABP), com as seguintes interações: fungos (ABP) x bactérias (BNA), e bactérias (ABP) x bactérias (BNA); e dois métodos: (1) método com o uso de meio de cultura NYDA, e (2) método com o uso de meios específicos para cada bactéria.

PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Microrganismos

Fungos – foram utilizados quatro fungos, sendo: 1) CMM 1039 (*Trichoderma asperellum*, estirpe UFRA T06); 2) CMM1040 (*Trichoderma asperellum*, estirpe UFRA T09); 3) CMM 1041 (*Trichoderma asperellum*, estirpe UFRA T12); 4) CMM 1042 (*Trichoderma asperellum*, estirpe UFRA T52).

Bactérias – foram avaliadas dez bactérias, sendo: 1) CMM 676 (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587); 2) CMM 677 (*Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 5019); 3) CMM 678 (*Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5079); 4) CMM 679 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, SEMIA 5080); 5) CMM 1132 (*Bacillus* sp., estirpe 82R); 6) CMM 973 (*Burkholderia pyrocinia*, estirpe R46); 7) CMM972 (*Pseudomonas fluorescens*, estirpe R55); 8) CMM 1 (*Pseudomonas fluorescens*, estirpe CLZG1); 9) CMM

45 (*Pseudomonas* sp.); 10) CMM105 (*Bacillus megaterium*).

Os acessos usados neste trabalho estavam preservados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT), sendo recuperados em meios de cultura Ágar Nutritivo (bactérias) e Batata Dextrose Ágar (fungos). Na Tabela 1 constam as funcionalidades das bactérias e fungos avaliados.

Tabela 1. Funcionalidade das bactérias e fungos avaliados nos testes de antagonismo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2020.

Acesso	Grupo taxonômico	Função
CMM 1039	Fungo	Controle Biológico
CMM 1040	Fungo	Controle Biológico
CMM 1041	Fungo	Controle Biológico
CMM 1042	Fungo	Controle Biológico
CMM 972	Bactéria	Controle Biológico
CMM 973	Bactéria	Controle Biológico
CMM 1132	Bactéria	Controle Biológico
CMM 676	Bactéria	Fixação de Nitrogênio
CMM 677	Bactéria	Fixação de Nitrogênio
CMM 678	Bactéria	Fixação de Nitrogênio
CMM 679	Bactéria	Fixação de Nitrogênio
CMM 1	Bactéria	Degradação de Agrotóxico
CMM 45	Bactéria	Degradação de Agrotóxico
CMM 105	Bactéria	Degradação de Agrotóxico

Atividade antagonista

Para verificação da atividade antagonista empregou-se os seguintes meios

de cultura: 1- fungos contra bactérias: (a) extrato de carne, extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar (NYDA) (Pusey e Wilson, 1984); e (b) extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) (Vincent, 1970);

2- bactérias contra bactérias: (a) agar triptona de soja (TSA Merck®, Darmstadt, Alemanha); e (b) extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) (Vincent, 1970).

Os testes foram realizados em triplicata e as medidas dos diâmetros dos halos obtidas com o uso de paquímetro. O controle consistiu no cultivo de cada microrganismo no meio de cultura específico, sendo bactérias semeadas pelo método do espalhamento com alça de *Drigalski* e fungos por meio de discos de crescimento depositados no centro da placa de Petri.

- *Teste de antagonismo de fungos como agentes de biocontrole contra bactérias degradadoras de agrotóxicos e fixadoras de nitrogênio*

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Ágar Nutritivo e incubadas a 28 °C por 48 horas. Posteriormente, para cada bactéria, foram realizadas suspensões em solução fisiológica e a concentração celular avaliada de acordo com o tubo n° 0,5 da escala de MacFarland. Após, foram retiradas alíquotas de 100µl de cada suspensão bacteriana e, por meio do método de espalhamento, feita a semeadura em placas de Petri contendo

os meios de cultura específicos para cada bactéria.

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubados a 25 °C por sete dias. Na sequência, um disco de micélio do fungo de 6 mm de diâmetro, foi retirado e depositado no centro da placa de Petri semeada com a bactéria testada como antagonizada, sendo incubadas a 28 °C por 48 horas. A atividade antagônica foi avaliada pela medição do halo de inibição dos fungos em comparação com as placas de Petri controles que continham apenas o crescimento do antagonista.

- *Teste de antagonismo de bactérias como agentes de biocontrole de pragas contra bactérias degradadoras de agrotóxicos e fixadoras de nitrogênio*

Baseado na metodologia de culturas pareadas utilizado por Mello et al. (2007), que consistiu na confrontação direta das bactérias em placas de Petri contendo meio de cultura sólido específico e posterior análise de inibição de uma bactéria em relação a outra (Brito et al., 2018). Inicialmente, placas de Petri foram inoculadas em metade da área com uma camada de células da bactéria candidata a antagonista. Posteriormente, bactérias antagonizadas foram riscadas em linhas perpendiculares à camada de células, partindo-se de uma suspensão de células diluídas (10^5 UFC mL⁻¹). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. A atividade antagônica foi determinada pela mensuração da inibição

sobre cada acesso bacteriano (faixa sem crescimento) em comparação com as placas de Petri controles que continham apenas o crescimento das bactérias antagonizadas.

As bactérias fixadoras de nitrogênio não apresentaram crescimento em meio NYDA e, em função disso, utilizou-se o meio YMA em todas interações com os demais microrganismos. Na Tabela 2 são apresentados os resultados da ação dos agentes fúngicos contra bactérias diazotróficas. Os fungos *Trichoderma asperellum* estirpes UFRA T06, UFRA T12, UFRA T52 não inibiram o crescimento das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 fixadoras de nitrogênio. A ação antagônica foi verificada somente do fungo *Trichoderma asperellum* estirpe UFRA T09 contra as bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo que o maior efeito inibitório foi com *B. japonicum* SEMIA 5079 (5 mm) e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (3 mm).

Porém, salientamos que essa zona de inibição do crescimento demonstrou baixo potencial do *Trichoderma asperellum* estirpe UFRA T09 para supressão de estirpes de *Bradyrhizobium*. Pesquisas realizadas com linhagens de espécies de *Trichoderma* comprovam o potencial antagônico contra fungos e bactérias (Bettiol; Morandi, 2009), considerando os mecanismos de ação desse fungo que envolve antibiose, micoparasitismo e competição (Monte et al., 2019) e, ainda, a capacidade de produzir aproximadamente 40 substâncias que

possuem atividade antibiótica (Venancio et al., 2019).

As estirpes de *Trichoderma asperellum* também não inibiram o crescimento das bactérias degradadoras de agrotóxicos, demonstrando a capacidade de interação benéfica com *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp. e *Bacillus megaterium*, organismos componentes da comunidade microbiana de solos ori-zícolas, nas terras baixas do RS .

Da mesma forma, não houve efeito deletério das bactérias agentes de biocontrole sobre as bactérias fixadoras de nitrogênio . Apesar da capacidade de supressão de diversos patógenos das rizobactérias *Bacillus* sp. estirpe 82R, *Burkholderia pyrrocinia* estirpe R46 e *Pseudomonas fluorescens* estirpes R55, promovem simultaneamente a promoção do crescimento e redução da severidade da brusone em arroz (Filippi et al., 2011). Especialmente a *Burkholderia pyrrocinia* estirpe R46 (BRM32113), isolada da rizosfera de arroz, apresenta efetividade para o crescimento dessa cultura (Arriel-Elias et al., 2019). Kazempour (2004) também verificou o potencial de isolados de *P. fluorescens* no controle de *Rhizoctonia solani* Kühn em arroz, constituindo-se um agente de biocontrole que pode reduzir em 52% a intensidade da doença e promover o crescimento de plantas de arroz. Pussey; Wilson (1984) relatam que *Bacillus* spp. ocupam o mesmo nicho que muitos patógenos e têm a capacidade de produzir uma ampla gama de substâncias bioativas com atividade

Tabela 2. Valores dos halos de inibição (mm) dos fungos biocontroles (antagonistas) contra o crescimento das bactérias fixadoras de nitrogênio (antagonizadas). Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2020.

Fungos	Bactérias			
	<i>B. elkanni</i> SEMIA 587	<i>B. elkanni</i> SEMIA 5019	<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080
<i>Trichoderma asperellum</i> , UFRA T06	0	0	0	0
<i>Trichoderma asperellum</i> , UFRA T09	1,0	1,0	5,0	3,0
<i>Trichoderma asperellum</i> , UFRA T12	0	0	0	0
<i>Trichoderma asperellum</i> , UFRA T52	0	0	0	0

antibiótica, podendo promover direta e/ou indiretamente o crescimento da planta, a resistência a doenças e a tolerância ao estresse abiótico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação do efeito antagonístico de agentes de biocontrole de pragas (fungos e bactérias) sobre outros microrganismos benéficos é importante para o manejo biológico integrado e sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Nesse contexto, metodologias que envolvam fungos e/ou bactérias antagonistas e bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas antagonizadas, com funções de fixação biológica de nitrogênio e degradação de agrotóxicos, respectivamente, complementam as pesquisas na área do controle biológico de pragas e fornecem base técnica para soluções biológicas empregadas pelos produtores. Neste trabalho, pode-se observar, por meio da metodologia adotada de uso de meios de cultura específicos para o crescimento de cada

microrganismo, considerando-se sua funcionalidade, que somente um agente de biocontrole, estirpe da espécie *Trichoderma asperellum* (UFRA T09), apresentou certo grau de ação antagonística sobre as bactérias diazotróficas (*B. elkanni*, SEMIA 587; *B. elkanni*, SEMIA 5019; *B. japonicum*, SEMIA, 5079 e *B. diazoefficiens*, SEMIA 5080); que bactérias como agentes de biocontrole (*Bacillus* sp. estirpe 82R; *Burkholderia pyrrocinia*, estirpe R46; *Pseudomonas fluorescens*, estirpe R55) não apresentaram ação antagonística sobre bactérias degradadoras de agrotóxicos e fixadoras de nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Clima Temperado.

REFERÊNCIAS

- ARRIEL-ELIAS, M. T.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; SOUZA, T. P. de. Induction of resistance in rice plant using bioproducts produced from *Burkholderia pyrocinia* BRM 32113. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 19705-19718, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05238-3>
- CROPLIFE. **Brasil se destaca no mercado de controle biológico**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/brasil-se-destaca-no-mercado-de-controle-biologico/> Acesso em: 18 set. 2020.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 241 p.
- BRITO, T. S.; LIMA, W. F de; PAN, R.; PORFIRIO, M. D.; CANELLO, K. T.; CHAVES, E. I. D. Antagonismo de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho no biocontrole de fitopatógenos. **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 11, n. 1, p. 81-91, 2018.
- FILIPPI, M. C. C.; da SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, p. 160-166, 2011. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.04.016
- GOMES, N. S.; JUNIOR, A. G.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n. 43, p. 123-138, 2001.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- KAZEMPOUR, M. N. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. **Plant Pathology Journal**, v. 3, p. 88-96, 2004. doi: 10.3923/ppj.2004.88.96
- MARTINS, J. F. da S.; GRÜTZMACHER, A. D.; CUNHA, U. S. da. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES, JÚNIOR., A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.
- MATTOS, M. L. T.; FAGUNDES, P. R. R.; GUIDONI, A. L.; GALARZ, L. A.; FACIO, M. L. P. Interação entre cultivares de arroz irrigado com bactérias diazotróficas associativas. In: REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA A RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA, 16., 2012, Londrina. RELARE 16, 2012.
- MATTOS, M. L. T.; CASTRO, L. A. S. de; GALARZ, L. A.; CROCHEMORE, A. G. Degrading microorganisms preserved in the multifunctional microorganism cultures collection of Embrapa Temperate Climate: biotechnological interest. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CULTURE COLLECTIONS, 12., 2010. Florianópolis. **Biological resource centers: gateway to biodiversity and services for innovation in biotechnology: proceedings...** Florianópolis: WFCC ICC 12, 2010.
- MATTOS, M. L. T.; CASTRO, L. A. S.; SANTOS, I. B. Biorremediação de solo contaminado com o herbicida Clomazona: isolamento de rizobactérias do sorgo cultivado em solo de varzea subtropical. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília. p. 539-539.
- MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAUNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, 2007.
- MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- PUSSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v. 68, p. 753-756, 1984.

VENANCIO, W. S.; MARTINS, R. V.;
MARZAROTTO, F. de O.; BORATTO, V. N.
M.; DALLAGO, E. G.; BORATTO, I. V. Uso
do *Trichoderma* em cereais. In: MEYER, M.
C. MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Ed.).
Trichoderma: uso na agricultura. Brasília, DF:
Embrapa, 2019.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical
study of root-nodule bacteria.** Oxford: Blackwell
Scientific Publications, 1970. 164 p. (IBP
Handbook n. 15).

Embrapa Clima Temperado
BR 392 km 78 - Caixa Postal 403
CEP 96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição
Obra digitalizada



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Clima Temperado

Presidente
Luis Antônio Suíta de Castro
Vice-Presidente
Walkyria Bueno Scivittaro
Secretária-Executiva
Bárbara Chevallier Cosenza

Membros
*Ana Luíza B. Viegas, Fernando Jackson,
Marilaine Schaun Pelufé, Sônia Desimon*

Revisão de texto
Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica
Marilaine Schaun Pelufé

Editoração eletrônica
Fernando Jackson

Foto da capa
Maria Laura T. Mattos